

サンブリーケ OPT 固相抽出カートリッジ と高速液体クロマトグラフィーによる ヨーロッパブナ (*Carassius carassius*) 中の ホルモン類の分析

アプリケーションノート

食品安全性

著者

Chen-Hao Zhai and Yun Zou
Agilent Technologies Co. Ltd.
412 Ying Lun Road
Waigaoqiao Free Trade Zone
Shanghai 200131
China

Rou-Nan Jin
Second Military Medical University
259 Shanghai Road
Shanghai 200093
China

概要

固相抽出法 (SPE) と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の組み合わせを最適化することにより、ヨーロッパブナ (*Carassius carassius*) の肉に含まれるホルモン 16 種 (エストリオール、ブレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、ブレドニゾン、メチルブレドニゾロン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、酢酸トリアムシノロン、ゲストリノン、酢酸ブレドニゾロン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸ブレドニゾン、エストラジオール、酢酸コルチゾン、メチルテストステロン、エストロン) を抽出、測定しました。Agilent サンブリーケ OPT (60 mg, 3 mL) SPE、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム (4.6 mm × 250 mm, 5 µm) を HPLC と組み合わせて使用した結果、これらの化合物を良好に分析できました。回収率は 76.2 ~ 106.1 %、相対標準偏差 (RSD) は 1.7 ~ 8.9 % となりました。



Agilent Technologies

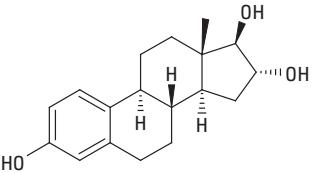
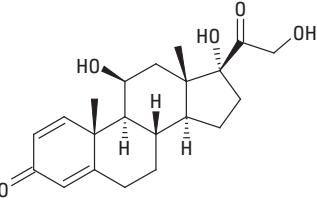
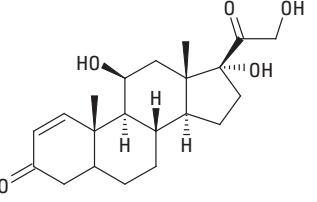
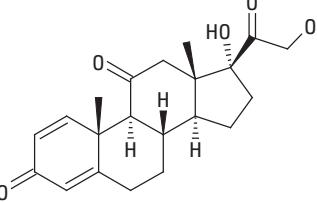
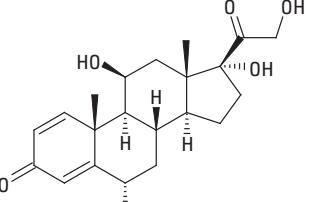
はじめに

昨今、食の安全は、世界中でより一層の注目を集めています。様々な食品添加物による人体への影響が懸念されています。ホルモン類は、一般的に使用されている食品添加物の1つです。グルココルチコイドの長期摂取は、高血糖、骨粗しょう症、先天的欠損症、免疫力低下などを引き起こすおそれがあります。

ほかにも、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロンなどのホルモンが発がん性であり、乳がん、子宮がんなどを引き起こすことがわかっています。多くの国では、これらの化合物の食品中の残留量を明確に規制しています。

Agilent サンブリーク OPT SPE カートリッジを使用して、ヨーロッパブナの肉から 16種のホルモン(表1)を抽出した後、HPLCで分析しました。

表1. 本実験の対象ホルモン

番号	名称	CAS番号	Log P	構造
1	エストリオール	50-27-1	2.45	
2	プレドニゾロン	50-24-8	1.66	
3	ヒドロコルチゾン	50-23-7	1.79	
4	プレドニゾン	53-03-2	2.07	
5	メチルプレドニゾロン	83-43-2	2.06	

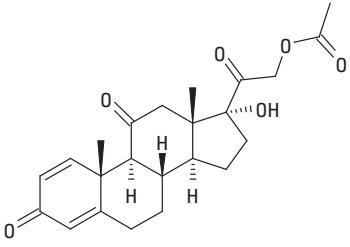
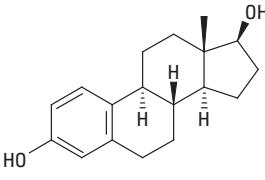
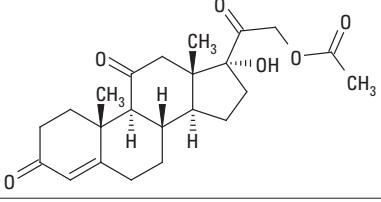
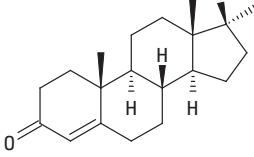
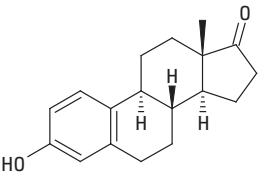
(続き)

表 1. 本実験の対象ホルモン

番号	名称	CAS 番号	Log P	構造
6	ベタメタゾン	378-44-9	1.93	
7	デキサメタゾン	50-02-2	1.93	
8	酢酸トリアムシノロン	67-78-7	1.9	
9	ゲストリノン	16320-04-0	NA	
10	酢酸プレドニゾロン	52-21-1	NA	
11	メチルプレドニゾロン	83-43-2	NA	

(続き)

表1. 本実験の対象ホルモン

番号	名称	CAS番号	Log P	構造
12	酢酸プレドニゾン	125-10-0	NA	
13	エストラジオール	50-28-2	3.57	
14	酢酸コルチゾン	50-04-4	2.35	
15	メチルテストステロン	58-18-4	NA	
16	エストロン	53-16-7	4.03	

実験

試薬および化学薬品類

使用した試薬および溶媒は、すべて HPLC グレードまたは分析グレードのものです。ホルモンの標準品は NICPBP (中国薬品生物製品検定所) から、ヨーロッパブナは地元の市場で購入しました。

標準液の原液 (1 mg/mL) は、メタノールで調製し、冷凍保存 (-20 °C) しました。標準液は、原液をメタノールで希釈したものを使用しました。標準液は、毎週新たに調製し 4 °C 以下で保存しました。

SPE カートリッジには Agilent サンブリーク OPT (3 mL、60 mg、部品番号 5982-3036) を使用しました。分析にはダイオードアレイ検出器 (DAD) を備えた Agilent 1200 シリーズ HPLC を使用しました。分析用カラムには Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (5 µm 250 mm × (内径) 4.6 mm、部品番号 959990-902) を使用しました。サンプル溶液のろ過には Agilent 0.45 µm PTFE プレミアムシリンジフィルタ (部品番号 5185-5836) を使用しました。

HPLC 条件

カラム:	ZORBAX Eclipse Plus C18 250 mm × 4.6 mm、5 µm		
流量:	1.0 mL/min		
注入量:	5 µL		
カラム温度:	18 °C		
検出波長:	230 nm		
移動相:	水/アセトニトリルのグラジェント		
	時間 (分)	% 水	% アセトニトリル
	0	70	30
	10	65	35
	23	50	50
	30	20	80

SPE 精製

- ヨーロッパブナの肉 200 g をホモジナイズし、清浄な密封容器にて -18 °C で保管します。
- ホモジナイズされたサンプル 1 g (0.01 gまで秤量) を 10 mL ポリプロピレン製遠心分離管に入れ、メタノール 5 mL を加えます。
- 1 分間攪拌します。
- 氷浴しながら 10 分間超音波抽出を行います。
- サンプルを 4,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄 3 mL を採取します。
- 清浄な試験管に上澄を移し、40 °C 以下の温度で 窒素ガスを吹き付けて溶媒を蒸発させます。
- 残渣を、5 % メタノール水溶液 5 mL で再溶解します。

SPE 精製

SPE による抽出手順は、図 1 に示す通りです。Agilent サンブリーク OPT カートリッジは、メタノール 3 mL、次いで水 5 mL でコンディショニングします。抽出液 5 mL (試料 0.6 g相当) を、1 mL/min の速度でサンブリーク OPT カートリッジに通過させます。抽出液がカートリッジから完全に流出したら、カートリッジを 30 % メタノール水溶液で洗浄し、流出液は廃棄します。その後、2.0 kPa 以下で減圧しながら、カートリッジを 3 分間乾かします。カートリッジにメタノール 6 mL を通液し、回収した溶出液を 40 °C 以下の温度で窒素ガスを吹き付けて乾燥させます。残渣をメタノールに溶解し全量を 1.0 mLとした後、0.45 µm PTFE メンブランフィルターでろ過してから HPLC で分析します。

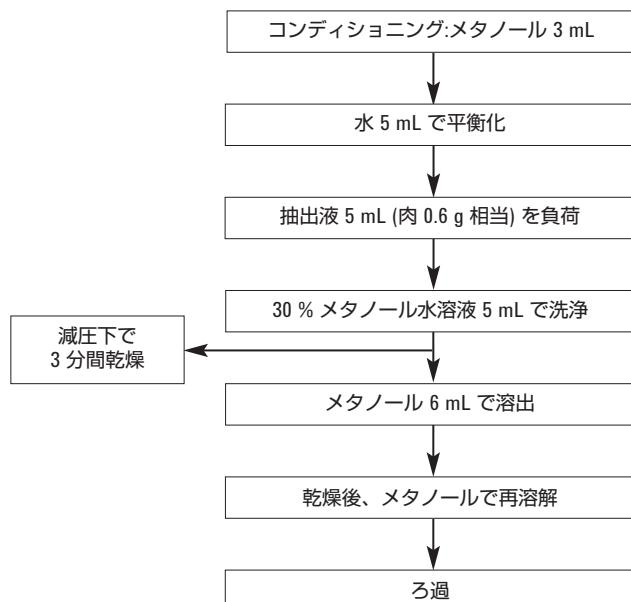


図 1. ヨーロッパブナの肉に含まれるホルモンの SPE 手順

結果と考察

直線性、検出下限

各ホルモンの直線性はピーク面積から、検出下限 (LOD) は S/N=3 となる濃度から求めました。直線性の範囲は、1 ~ 100 mg/kg です。表 2 に直線性および LOD を示します。

表 2. 各ホルモンの直線性および LOD

番号	化合物名	回帰式	相関係数	LOD (mg/kg)
1	エストリオール	$Y = 8.096 \times -0.824$	0.9998	0.5
2	ブレドニゾロン	$Y = 17.418 \times -2.088$	0.9999	0.3
3	ヒドロコルチゾン	$Y = 15.746 \times -1.518$	0.9999	0.4
4	ブレドニゾン	$Y = 20.192 \times -2.152$	0.9998	0.3
5	メチルブレドニゾロン	$Y = 16.986 \times -1.894$	0.9999	0.4
6	ベタメタゾン	$Y = 20.439 \times -1.106$	0.9997	0.3
7	デキサメタゾン	$Y = 20.176 \times -2.176$	0.9999	0.2
8	酢酸トリアムシノロン	$Y = 16.374 \times -1.558$	0.9997	0.4
9	ゲストリノン	$Y = 6.370 \times -0.668$	0.9998	1.4
10	酢酸ブレドニゾロン	$Y = 15.589 \times -1.627$	0.9999	0.4
11	酢酸ヒドロコルチゾン	$Y = 15.051 \times -1.584$	0.9999	0.5
12	酢酸ブレドニゾン	$Y = 24.106 \times -2.401$	0.9997	0.2
13	エストラジオール	$Y = 8.709 \times -0.635$	0.9999	0.9
14	酢酸コルチゾン	$Y = 19.826 \times -2.336$	0.9996	0.5
15	メチルテストステロン	$Y = 19.980 \times -2.209$	0.9996	0.3
16	エストロン	$Y = 10.701 \times -0.847$	0.9999	0.6

回収率および再現性

分析法の精度を確認するために、ヨーロッパブナ肉にホルモン標準液を添加したサンプルの回収率を 2、5、10 mg/kg の各レベルで測定しました。分析は、各レベルにおいて 6 回ずつ行いました。図 2～4 は、それぞれプランク、標準液、および標準液添加サンプル (2 mg/kg) のクロマトグラムを示します。回収率と再現性のデータは表 3 を参照してください。

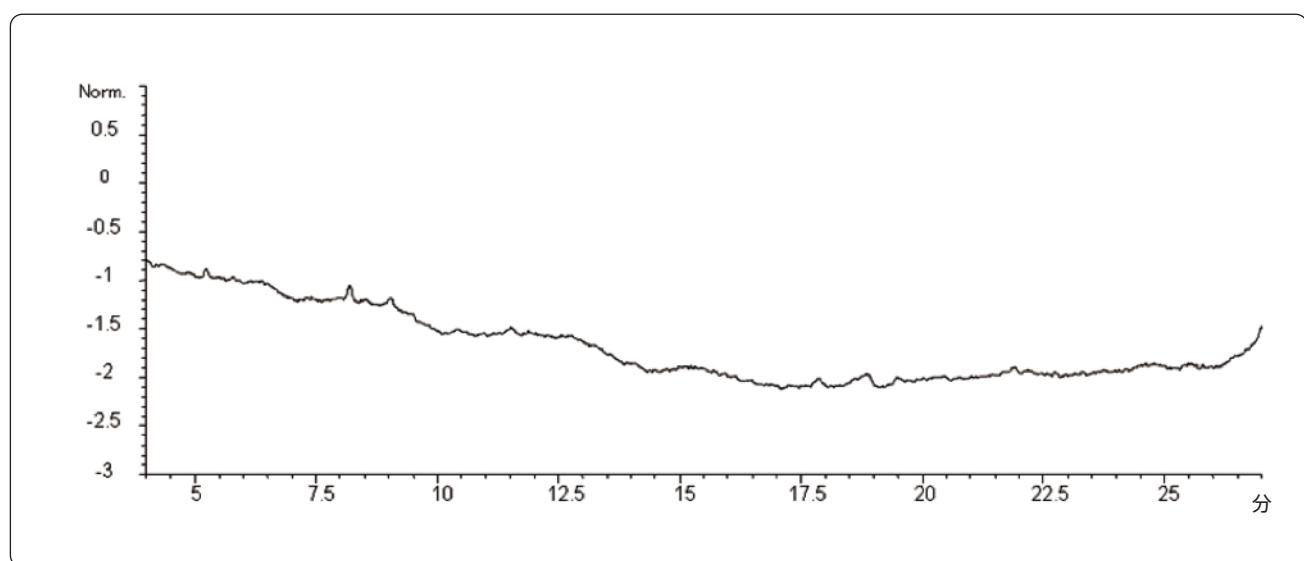
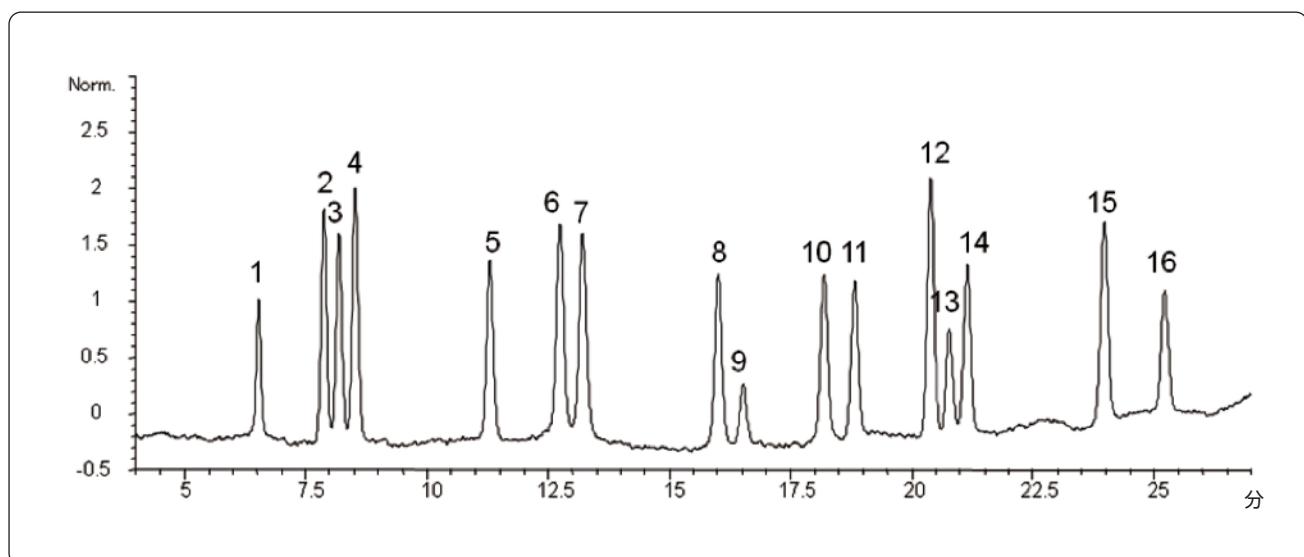
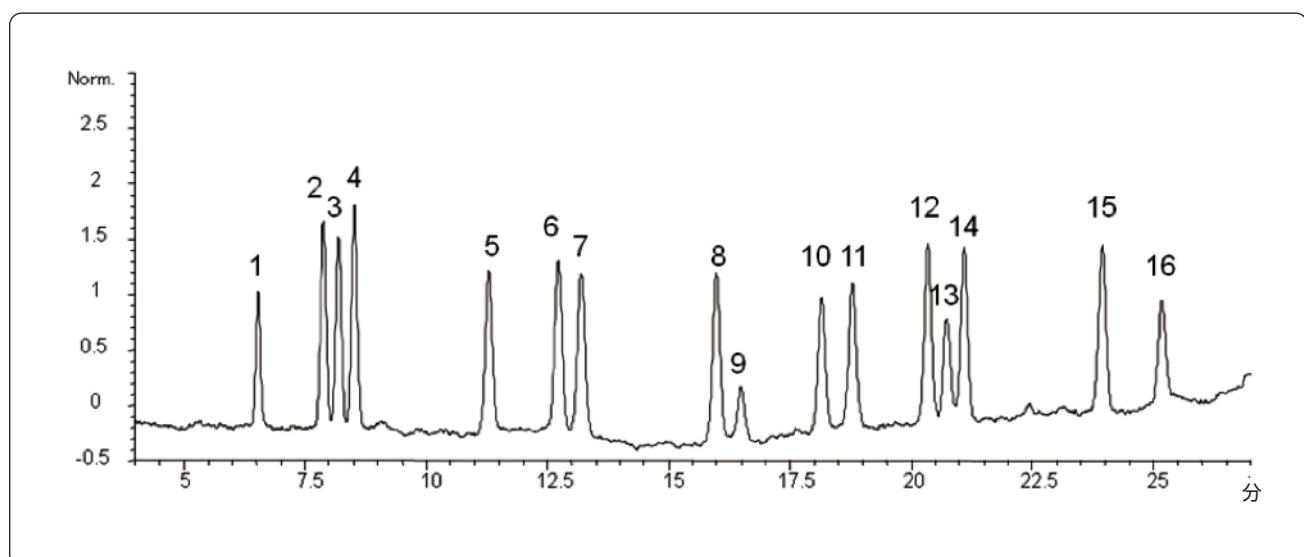


図 2. ヨーロッパブナ肉のプランクのクロマトグラム



- | | | | |
|-------------|---------------|----------------|----------------|
| 1. エストリオール | 5. メチルプレドニゾロン | 9. ゲストリノン | 13. エストラジオール |
| 2. プレドニゾロン | 6. ベタメタゾン | 10. 酢酸プレドニゾロン | 14. 酢酸コルチゾン |
| 3. ヒドロコルチゾン | 7. デキサメタゾン | 11. 酢酸ヒドロコルチゾン | 15. メチルテストステロン |
| 4. プレドニゾン | 8. 酢酸トリアムシノロン | 12. 酢酸プレドニゾン | 16. エストロン |

図 3. ホルモン標準液 (2 mg/kg) のクロマトグラム



- | | | | |
|-------------|---------------|----------------|----------------|
| 1. エストリオール | 5. メチルプレドニゾロン | 9. ゲストリノン | 13. エストラジオール |
| 2. プレドニゾロン | 6. ベタメタゾン | 10. 酢酸プレドニゾロン | 14. 酢酸コルチゾン |
| 3. ヒドロコルチゾン | 7. デキサメタゾン | 11. 酢酸ヒドロコルチゾン | 15. メチルテストステロン |
| 4. プレドニゾン | 8. 酢酸トリアムシノロン | 12. 酢酸プレドニゾン | 16. エストロン |

図 4. ヨーロッパブナ肉のホルモン標準液添加サンプル (2 mg/kg) のクロマトグラム

表3. ヨーロッパブナ肉に含まれるホルモン類のSPEによる回収率および相対標準偏差

化合物名	スパイク添加レベル (mg/kg)	Recovery (%)	RSD (n = 6, %)
エストリオール	2	100.4	2.2
	5	106.1	1.9
	10	102.4	4.4
プレドニゾロン	2	89.4	3.8
	5	90.9	7.6
	10	100.7	2.9
ヒドロコルチゾン	2	85.3	6.7
	5	91.4	7.6
	10	101.4	3.4
プレドニゾン	2	82.5	7.2
	5	92.1	5.2
	10	100.7	2.9
メチルプレドニゾロン	2	83.2	8.3
	5	93.6	3.2
	10	97.4	1.7
ベタメタゾン	2	88.3	8.9
	5	99.6	4.9
	10	100.8	3.8
デキサメタゾン	2	79.1	4.3
	5	98.4	5.3
	10	98.4	3.9
酢酸トリアムシノロン	2	86.7	8.4
	5	97.6	5.9
	10	97.9	4.1
ゲストリノン	2	78.0	6.6
	5	78.8	8.1
	10	85.3	8.0
酢酸プレドニゾロン	2	86.9	7.3
	5	101.2	4.3
	10	101.9	5.7
酢酸ヒドロコルチゾン	2	87.3	6.8
	5	102.7	5.1
	10	101.5	7.9
酢酸プレドニゾン	2	76.7	7.7
	5	94.1	3.5
	10	97.7	4.3
エストラジオール	2	78.7	4.2
	5	94.7	3.5
	10	97.4	4.8
酢酸コルチゾン	2	82.8	6.9
	5	87.8	6.5
	10	94.4	4.1
メチルテストステロン	2	82.9	3.4
	5	91.9	4.9
	10	93.6	4.6
エストロン	2	76.2	6.4
	5	90.0	8.7
	10	93.9	5.9

結論

親水性と親油性を併せ持った高分子吸着剤である Agilent サンプリーク OPT は、極性化合物と非極性化合物の双方に対し保持力を持つため、ヨーロッパブナ肉に含まれる複数のホルモンの精製および濃縮を、単一のカートリッジで簡単かつ効果的に行うことができます。標準液に基づく回収率および再現性（通常 10% 未満）は、ヨーロッパブナ肉におけるホルモン残留率の測定に必要な条件を満たしています。ヨーロッパブナ肉抽出物を Agilent サンプリーク OPT で処理したサンプルに含まれる夾雑物は非常に少なく、ホルモン類の分析には影響を及ぼしませんでした。

製品情報

部品番号	説明
5982-3013	OPT Polymer - Box, 100x 1 mL tubes, 30 mg
5982-3036	OPT Polymer - Box, 50x 3 mL tubes, 60 mg
5982-3067	OPT Polymer - Box, 30x 6 mL tubes, 150 mg
5982-3096	OPT Polymer - 96 Well Plate, 10 mg
95990-902	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 250 mm × 4.6 mm, 5 µm
5185-5836	Agilent PTFE 0.45 µm Premium Syringe Filter

詳細情報

アジレントの製品およびサービスの詳細は、弊社ウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付隨的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
April 1, 2009
5990-3845JAJP



Agilent Technologies